

Lokken en bestrijden van de taxuskever

Eindrapportage

Auteurs: Ivonne Elberse & Rob van Tol

Praktijkonderzoek Plant en Omgeving,
sector Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
PPO projectnummer 32 340213 00

Lisse, januari 2009

© 2009 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit onderzoek is gefinancierd door het productschap Tuinbouw



PPO-Projectnummer: 32 340213 00

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

Adres : Professor van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 – 46 21 21

Fax : 0252 – 46 21 00

E-mail : info.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Publiekssamenvatting

De taxuskever (*Otiorhynchus sulcatus*) vormt wereldwijd één van de belangrijkste plagen in de boomkwekerij. De kevers eten van de bladeren van allerlei planten, leggen eieren op de bodem en de daaruit komende larven eten van de plantenwortels. De vraat aan de plantenwortels veroorzaakt grote economische schade aan de gewassen (groeiremming en afsterving planten). Bestrijding van de kevers is lastig. Binnen dit project is gezocht naar een lokstof. Deze zou goed kunnen helpen bij het waarnemen van het insect, want de kevers zijn 's nachts actief en daarom overdag niet gemakkelijk waar te nemen. Met een goede waarneming van de kever zou een locale bestrijding mogelijk worden, wat winst oplevert voor het milieu. Bovendien zou een geschikte lokstof in combinatie met een (nieuw) bestrijdingsmiddel kunnen worden ingezet, vergelijkbaar met slakkenkorrels: de kevers worden naar de korrels gelokt, vreten ervan en gaan dan dood.

PPO en PRI hebben, samen met twee bedrijven, Denka International en BASF, gezocht naar een geschikte lokstof.

In een laboratoriumproef lukte het om met een extract van *Euonymus* 85% van de kevers te lokken. In dit project is dit extract verder ontrafeld. Er bleken verschillende geurstoffen in te zitten, die in laboratoriumproeven aantrekkelijk waren voor de taxuskever. Uiteindelijk is een mengsel van vier aantrekkelijke stoffen gemaakt om buiten te testen. Het maken van een goede proefopstelling bleek gecompliceerder te zijn dan aanvankelijk gedacht. Binnen de beschikbare projectduur en budget was het niet mogelijk om een betrouwbare proefmethode voor buiten te ontwikkelen. In overleg met de partners van het project is besloten om de proeven met lokstoffen te beëindigen. Daarom is nu niet bekend of dit mengsel ook in het veld een goede lokking geeft.

Inhoudsopgave

pagina

PUBLIEKSAMENVATTING	3
1 INLEIDING	7
1.1 Probleemstelling	7
1.2 Doelstellingen.....	8
1.3 Aanpak	8
2 BEPALEN ATTRACTIEVE COMPONENTEN (FASE 1 A)	11
2.1 Doel	11
2.2 Materiaal en methode.....	11
2.3 Resultaten	11
2.4 Discussie	12
2.5 Conclusie	12
2.6 Plannen.....	12
3 SAMENSTELLEN EN TESTEN ATTRACTIEVE MENGSELS (FASE 1B)	13
3.1 Biotoetsen laboratorium	13
3.1.1 Doel.....	13
3.1.2 Materiaal en methode.....	13
3.1.3 Resultaten	14
3.1.4 Discussie	16
3.1.5 Conclusie	16
3.1.6 Plannen.....	16
3.2 Biotoetsen buiten.....	16
3.2.1 Doel:.....	16
3.2.2 Materiaal en methode.....	16
3.2.3 Resultaten	19
3.2.4 Discussie	19
3.2.5 Conclusie	20
3.2.6 Plannen.....	20
4 REFERENTIES.....	21

1 Inleiding

1.1 Probleemstelling

De taxuskever (*Otiorhynchus sulcatus*) vormt één van de belangrijkste plagen in de boomkwekerij wereldwijd en is tevens een sleutelplaag bij de productie van kleinfruit (o.a. aardbei en veenbessen) elders in Europa en Noord-Amerika (USA en Canada). De kevers eten van de bladeren van planten, leggen eieren op de bodem en de daaruit komende larven eten van de plantenwortels. De vraat aan de plantenwortels veroorzaakt grote economische schade aan de gewassen (groeiremming en afsterving planten). Volgens de USDA (United States Department of Agriculture) wordt jaarlijks tussen de \$ 25 tot 70 miljoen aan middelen uitgegeven om in Amerika en Canada deze plaag te bestrijden. In Nederland wordt tussen de \$ 0,5 en 2 miljoen uitgegeven aan middelen om de plaag te beheersen. De totale kosten (arbeid, apparatuur en middelen) voor boomkwekers in Nederland toegerekend aan deze plaag wordt geschat op jaarlijks € 10 tot 17 miljoen.

Om taxuskevers goed aan te kunnen pakken, is het nodig om zowel de larven als de volwassen kevers te bestrijden. Momenteel zijn er in Nederland geen chemische bestrijdingsmiddelen voor vollegrondteelten beschikbaar die de larven effectief kunnen bestrijden. Biologische bestrijding met insectenpathogene aaltjes is wel mogelijk, maar de bestrijding in de vollegrond is wisselvallig. Een tweede behandeling is vaak nodig. Daarbij is het middel relatief duur en daardoor minder geschikt voor grootschalige toepassing. Sinds kort is voor de larvenbestrijding ook het middel BIO1020 beschikbaar. Dit middel is gebaseerd op de insectenparasitaire schimmel *Metarhizium anisopliae*.

Tot 2004 werden de volwassen kevers bestreden door gewasbespuitingen met het bestrijdingsmiddel acefaat. Dit middel is echter sinds augustus 2004 niet meer toegelaten. Het paste ook slecht in de geïntegreerde bestrijding van zowel deze kever als andere plagen, aangezien het niet selectief is, breed moet worden toegepast en daarmee de meeste natuurlijke vijanden van plagen uitschakelt. Het probleem was bij de start van dit project dus zeer nijpend voor de sector.

Er zijn daarom toen twee onderzoeken gestart. Eén onderzoek was gericht om op korte termijn tot een oplossing te komen door middelenonderzoek. Dit heeft tot nu toe enkele middelen opgeleverd, die perspectief bieden. Dit onderzoek wordt hier verder niet beschreven. Het andere onderzoek wordt in dit rapport beschreven en is gericht op een langere termijn oplossing.

Een gerichte lokale bestrijding van de taxuskever met een bestrijdingsmiddel kan de nadelige effecten van een volveldse bespuiting beperken. Voorwaarde voor een gerichte bestrijding in tijd en plaats is het tijdig kunnen waarnemen waar en wanneer de kevers verschijnen. Omdat de kevers 's nachts actief zijn en de larven in de bodem niet zichtbaar zijn, is eenvoudige visuele waarneming overdag in het veld niet mogelijk. Dit maakt het noodzakelijk om specifieke waarnemingshulpmiddelen, bijvoorbeeld vallen met een aantrekkelijke geurstof, te ontwikkelen.

Een geschikte lokstof zou bovendien in combinatie met een (nieuw) bestrijdingsmiddel, vergelijkbaar met slakkenkorrels, kunnen worden ingezet. Deze vorm van bestrijden maakt het mogelijk om toelating van een bestrijdingsmiddel te vergemakkelijken. Het voordeel is namelijk dat er geen drift en uitspoeling naar bodem en water plaatsvindt, in tegenstelling tot de gebruikelijke gewasbespuitingen.

Plaatselijke biologische bestrijding met insectenpathogene aaltjes kan met een waarnemingsmethode effectiever worden uitgevoerd en daarmee worden de kosten van deze vorm van bestrijding sterk gereduceerd. Lagere kosten en hogere betrouwbaarheid van bestrijding zullen de bereidheid onder kwekers vergroten om biologische bestrijding toe te passen.

In eerdere projecten zijn extracten van planten getest op hun attractiviteit voor de volwassen kevers. In labproeven lukte het om 90% van de kevers naar jonge door de kever aangevreten bladeren van *Euonymus* en *Taxus* te lokken. Vervolgens is het gelukt om 85% van de kevers te vangen met extracten van *Euonymus* (Van Tol, 2002). In kleine kooiproeven zijn daarna verschillende valtypen getest in combinatie met dit extract. De gebruikte vallen waren echter onvoldoende goed en het extract niet sterk genoeg om veel kevers mee te vangen. Wel werden er aantoonbaar meer kevers gevangen in vallen met dan zonder extract van *Euonymus*. Zowel val als lokstof dient verbeterd te worden voordat ze in een veldproef getest kunnen worden op effectiviteit. Er zal moeten worden bepaald welke stoffen in het *Euonymus*-extract zorgen voor de lokkende werking. Deze stoffen zullen vervolgens tot een slow-release formulering verder moeten worden ontwikkeld om een bruikbaar instrument voor lokking in het veld te krijgen. In combinatie met een geschikte val en/of bestrijdingstechniek zal het een zeer effectief instrument worden om het probleem taxuskever te beheersen op kwekerijen.

1.2 Doelstellingen

1. Bepalen welke componenten in het *Euonymus* extract attractief zijn voor de taxuskever
2. Samenstellen en testen van attractieve mengsels van stoffen die aantrekkelijk zijn voor de taxuskever.
3. Het formuleren van de gevonden lokstof en het optimaliseren van de attractiviteit van de bait.
4. Het praktijkgeschikt maken van een lokval met bait waarmee taxuskevers gelokt en bestreden kunnen worden.

Het combineren en testen van geschikte valtypen en bestrijdingstrategieën met de ontwikkelde slow-release lokstof wordt slechts voor een deel in dit project meegenomen. Het registratietraject valt buiten dit project.

1.3 Aanpak

In dit project werken PPO Bollen, Bomen en Fruit, Plant Research International (PRI), Denka International en BASF samen. Fase 1 van het project is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw. Wanneer na fase 1 een lokstof beschikbaar is, die onder buitenomstandigheden werkt, gaan BASF en Denka International vanaf fase 2 het project financieren. Bovendien leveren Denka en BASF vanaf fase 2 bijdragen aan de uitvoering van het onderzoek.

Fase 1 (1 mei 2005 tot 1 mei 2006)

- **1 A Bepalen welke componenten in het *Euonymus* extract attractief zijn voor de taxuskever.**
- De geurreceptoren die van belang zijn voor waardplantherkenning bevinden zich op de antenne van het insect. Met behulp van de electroantennogram (EAG) techniek worden de reacties van de geurcellen op de componenten in het *Euonymus* extract waargenomen en gekwantificeerd. Door het combineren van gaschromatografie (GC) van het extract met de EAG respons voor de verschillende stoffen (GC-EAD) in het extract is het mogelijk om vast te stellen welke stoffen de kever herkent. GC-EAD is een beproefde en veelgebruikte techniek voor de analyse van sexferomonen en waardplantstoffen die aantrekkelijk zijn voor insecten.
- Door het combineren van gaschromatografie met massaspectrometrie (GC-MS) is het mogelijk om de componenten van complexe geurmengsels, die worden uitgescheiden door planten en insecten, te analyseren. De identificatie van relevante stoffen in het *Euonymus*-extract wordt mogelijk door het combineren van de resultaten van de GC-EAD met die van de GC-MS.
- Fase 1 A wordt uitgevoerd door PRI.

- **1 B. Samenstellen en testen van mengsels van stoffen die aantrekkelijk zijn voor de taxuskever.**
- De stoffen die worden geïdentificeerd met GC-EAD en GC-MS moeten getest worden op hun attractiviteit voor de kevers. Het is aannemelijk dat slechts een deel van de geïdentificeerde stoffen in een bepaalde verhouding attractief is voor de kever. Daarom zullen verschillende combinaties van deze stoffen in verschillende verhoudingen in een biotoets getest worden om zodoende het meest aantrekkelijke mengsel voor de taxuskever te selecteren. De biotoets wordt uitgevoerd door PPO.

Fase 2 (Fase 2 c 1 mei 2006 tot 1 mei 2007)

- **2 C Slow-release formulering maken van de ontwikkelde lokstof en testen op attractiviteit.**
- De geïdentificeerde plantstoffen zijn veelal stoffen die beschikbaar zijn als producten die door de voedingsmiddelenindustrie en parfumindustrie als uitgangsmateriaal worden gebruikt. Eventuele stoffen die niet als zodanig beschikbaar zijn, moeten worden gesynthetiseerd. Het juiste mengsel van stoffen zal vervolgens zodanig geformuleerd moeten worden in een slow-release product dat het attractief blijft voor de kever over een langere periode. De firma Denka heeft zich gespecialiseerd in het ontwikkelen van dergelijke producten voor insectenbestrijding. Denka zal verschillende testproducten ontwikkelen die getoetst worden in kooiproeven op hun aantrekkelijkheid voor de kever alvorens deze te combineren met diverse bestrijdingstechnieken in veldproeven. BASF zal bestrijdingsmiddelen voorstellen die kunnen worden gebruikt in combinatie met de lokstof. BASF zal in samenwerking met Denka onderzoeken welke bestrijdingsmiddelen kunnen worden toegevoegd aan de slow release formulering. Toetsing van de testproducten zal door PPO en PRI worden uitgevoerd.
- **2 D Combineren en testen van geschikte valtypen en bestrijdingstrategieën met de ontwikkelde slow-release lokstof. (1 mei 2007 tot 31 december 2007)**
- De firma's Denka en BASF richten zich beiden vanuit hun eigen expertises op de ontwikkeling en vermarkting van een waarnemingshulpmiddel voor de taxuskever. Dit deel van het onderzoek wordt slechts voor een deel in dit project meegenomen. Voortzetting van de veldproeven zal door PPO en PRI worden uitgevoerd. In een vervolgproject zal verdere opschaling van deugdelijkheidstesten plaats moeten vinden. Met de registratie van het te ontwikkelen product zal in fase 2 reeds rekening worden gehouden. De feitelijke registratieprocedure ligt buiten dit project.

2 Bepalen attractieve componenten (Fase 1 A)

2.1 Doel

In het *Euonymus*-extract identificeren van geurcomponenten waarop de antenne van de taxuskever reageert.

2.2 Materiaal en methode

In het voorjaar van 2005 werden jonge *Euonymus* scheuten verzameld en daaruit werd een extract gemaakt in paraffine olie.

PRI heeft de headspace (mengsel van geurstoffen dat wordt afgescheiden) opgevangen van de *Euonymus* planten, *Taxus baccata* planten en uitwerpselen van taxuskevers en dit geconcentreerd in kleine hoeveelheden hexaan. Deze hexaan met geurstoffen werd geïnjecteerd een systeem van gaschromatografie (GC) gecombineerd met electroantennogram detectie (EAD). De gaschromatograaf kan verschillende langskomende geurstoffen onderscheiden. De lucht werd ook langs een antenne van een taxuskever (electroantennogram) geleid en er werd per langskomende geurstof geregistreerd of die antenne een reactie gaf. De volgende headspaces werden op deze manier getest:

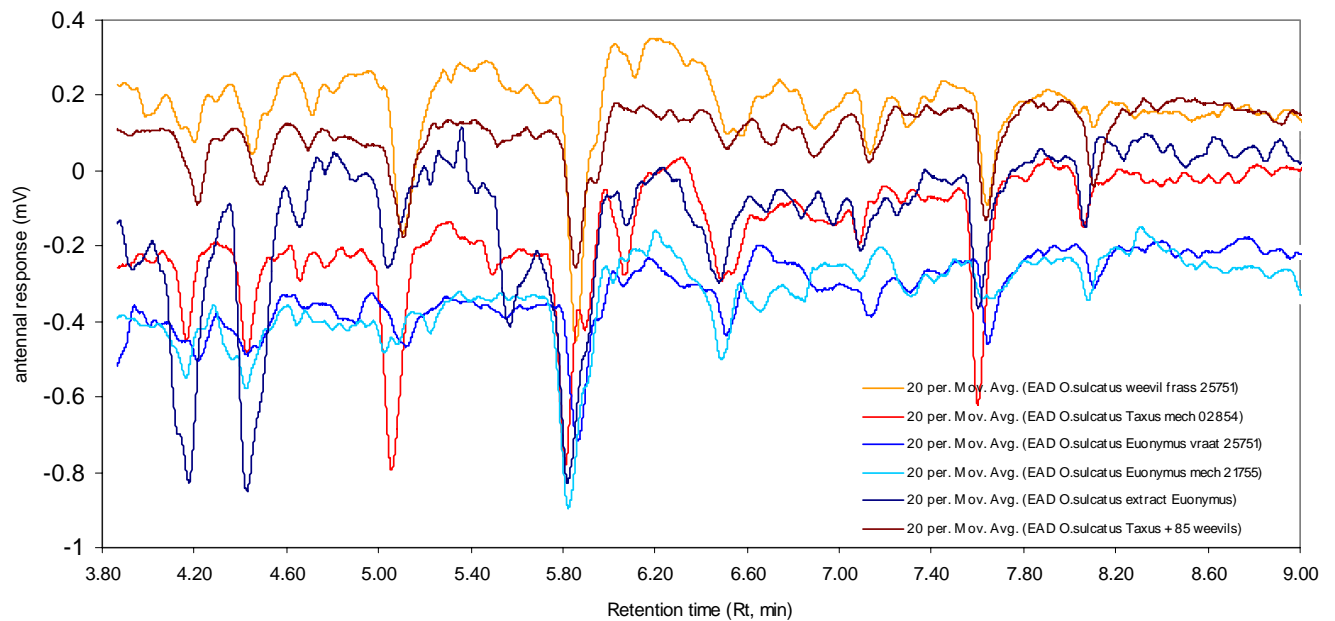
- *Taxus baccata*, mechanisch beschadigd
- *Taxus baccata* + 85 taxuskevers
- *Euonymus fortunei*, mechanisch beschadigd
- *Euonymus fortunei*, vraat door taxuskevers
- *Euonymus fortunei*, extract in paraffine olie
- Uitwerpselen taxuskevers

Vervolgens werd GC-MS uitgevoerd. Dit is een combinatie van gas chromatografie met massaspectrometrie. Zo werden de stoffen waarop de antenne een positieve reactie gaf, vergeleken met een database van MS-gegevens van allerlei geurstoffen. Op deze manier konden de componenten geïdentificeerd worden.

2.3 Resultaten

Figuur 2.1 geeft de resultaten van de GC-EAD weer. Hierin zijn enkele heel duidelijke pieken naar beneden te zien, die duiden op een reactie van de antenne. Bij deze pieken is ook te zien dat bij alle geteste geurmengsels de piek op dezelfde plaats verscheen. In totaal waren er twintig duidelijke en minder duidelijke pieken. Vervolgens zijn deze twintig stoffen met GC-MS geïdentificeerd. Deze stoffen zullen in dit rapport onder code worden behandeld.

Figuur 2.1 Resultaten van GC-EAD.



2.4 Discussie

Stoffen die een positieve reactie gaven op het antennogram, hoeven niet perse gebruikt te worden door de kever bij het zoeken naar een voedselplant. Het geeft alleen maar aan dat de kever de stof waarneemt. Er zijn vervolgens biotoetsen nodig om dit te bepalen. Die staan ook gepland voor fase 1B.

2.5 Conclusie

Uit GC-EAD en GC-MS zijn twintig stoffen gekomen die mogelijk iets te maken hebben met het aantrekkende effect van het *Euonymus*extract op taxuskevers.

2.6 Plannen

Bij nader inzien is de stap te groot om de biotoetsen meteen in de kas of op het veld uit te voeren. Het is efficiënter om eerst een screening in het laboratorium te doen (paragraaf 3.1) en daarna biotoetsen op grotere schaal (paragraaf 3.2).

3 Samenstellen en testen attractieve mengsels (Fase 1B)

3.1 Biotoetsen laboratorium

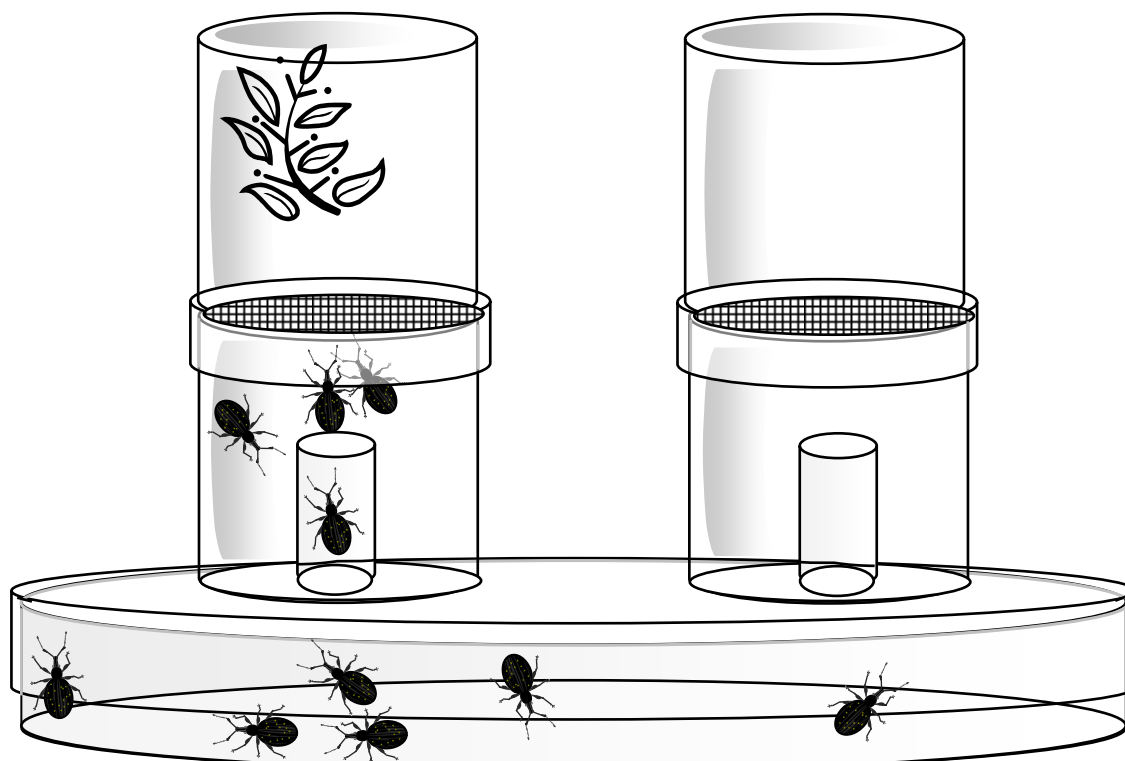
3.1.1 Doel

Het testen van de stoffen waarop de antenne van een taxuskever een reactie gaf. Het vinden van lokkende componenten of een mengsel van die componenten, die/ dat aantrekkelijk is voor taxuskevers.

3.1.2 Materiaal en methode

De kevers voor deze biotoetsen kwamen vanuit een kweek.

Vanaf augustus tot en met oktober 2005 heeft PRI stoffen, die een reactie van de taxuskeverantenne veroorzaakten, getest op hun aantrekking van taxuskevers in een laboratoriumtoets. Hierbij werden de kevers gedurende twee uur in een petrischaal getest (figuur 3.1). De reactie van taxuskevers op verschillende geurcomponenten in paraffine olie in verschillende concentraties werd vergeleken met de reactie op een controle en op het totale *Euonymus*extract. Vier van deze stoffen zijn per stof apart getest. Hoewel nog minimaal vier andere veelbelovende stoffen ook op deze manier getest zouden moeten worden, is de kans reëel dat niet één stof, maar een mengsel van stoffen voor de aantrekking zorgt. Daarom is op basis van de grootste pieken in de EAD-grafieken een mengsel gemaakt van tien stoffen en getest in een dergelijke biotoets.



Figuur 3.1 Schematische weergave van de proefopstelling van de biotoets in petrischalen in het laboratorium

Eind oktober bleek dat de kevers het niet goed meer reageerden: ze waren inmiddels te oud. In 2005 kon dus niet meer verder gegaan worden met de biotoetsen.

Verdergaand labwerk is nog nodig om de lokkende componenten van de niet-lokkende componenten in het bio-actieve synthetische mengsel van tien stoffen te scheiden en om de ratio van overgebleven stoffen te optimaliseren. Dit is nodig om een maximaal werkend conceptproduct te maken voor veldproeven. Diverse technieken zijn daarvoor beschikbaar.

In het voorjaar van 2006 werden de biotoetsen hervat. Het mengsel van tien aantrekkelijke stoffen werd getest met een factorieel design. Met een dergelijk design is het mogelijk om de relatieve waarde in aantrekkelijkheid van afzonderlijke componenten te testen, door een beperkt aantal mengsels te testen. De keuze van de tien te testen componenten is gemaakt door PRI in nauw overleg met de firma Denka. De resultaten van de tests met afzonderlijke componenten en de ervaring met van de mogelijke rol van bepaalde componenten in aantrekking of afweer in 2005 zijn gebruikt om tot het gekozen design te komen.

In het factorieel design werd het mengsel dat in 2005 aantrekkelijk bleek voor taxuskevers, gebruikt als standaard. Voor de andere zeven geteste mengsels werden vier componenten in elk mengsel getest en zes componenten waren variabel en werden niet in alle mengsels getest. Omdat concentratie-effecten een grote invloed kunnen hebben op aantrekking of afweer werden alle acht de mengsels in drie verschillende concentraties getest. De mengsels waren oplossingen in paraffine olie. De proef werd in acht herhalingen uitgevoerd, waarvan vier herhalingen werden uitgevoerd direct nadat de kevers in april uit de grond te voorschijn kwamen en vier herhalingen een maand later (mei). De kevers uit april legden nog geen eieren en de kevers, die in mei getest zijn, waren al wel in het eileg-stadium.

3.1.3 Resultaten

De vier stoffen die in het najaar van 2005 zijn getest (per stof apart) in een biotoets op laboratoriumschaal bleken niet aantrekkelijk.

Het mengsel van tien stoffen (mengsel 8) met de grootste pieken in de EAD grafieken bleek een aantrekkende werking te hebben in de proeven in april proeven (tabel 3.1) en een afstotende werking in de proeven van mei (tabel 3.2). In tabel 3.3 zijn de resultaten van april en mei samengenomen.

Tabel 3.1 resultaten biotoetsen april 2006. De proef was in vier herhalingen. Binnen het kader wordt voor de stoffen 1 t/m 11 per proef aangegeven of de stof is getest (+) of niet (-). Onder het kader wordt van de drie verschillende geteste concentraties aangegeven hoe aantrekkelijk het mengsel was (- = zeer afstotend, - = afstotend, 0 = neutraal, += aantrekkelijk, ++ = zeer aantrekkelijk. Groen = aantrekkelijk en oker = afstotend.

biotoets resultaten april 2006 (n=4)

Stoffen	Proefnummer							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	+	-	+	-	+	-	+
2	-	-	+	+	-	-	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+	+
4	+	-	-	+	+	-	-	+
5	+	-	-	+	-	+	-	+
6	+	+	-	-	-	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
0.001%	+	-	--	+	0	-	++	0
0.005%	0	--	--	++	0	--	0	++
0.01%	0	-	0	0	0	0	-	-

Tabel 3.2 resultaten biotoetsen mei 2006. De proef was in vier herhalingen. Binnen het kader wordt voor de stoffen 1 t/m 11 per proef aangegeven of de stof is getest (+) of niet (-). Onder het kader wordt van de drie verschillende geteste concentraties aangegeven hoe aantrekkelijk het mengsel was (- = zeer afstotend, - = afstotend, 0 = neutraal, += aantrekkelijk, ++ = zeer aantrekkelijk. Groen = aantrekkelijk en oker = afstotend.

biotoets resultaten mei 2006 (n=4)

Stoffen	Proefnummer							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	+	-	+	-	+	-	+
2	-	-	+	+	-	-	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+	+
4	+	-	-	+	+	-	-	+
5	+	-	-	+	-	+	-	+
6	+	+	-	-	-	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
0.001%	-	0	+	+	++	0	-	0
0.005%	0	--	++	--	--	--	--	--
0.01%	-	--	--	--	--	--	0	--

Tabel 3.3 resultaten biotoetsen april + mei 2006. Binnen het kader wordt voor de stoffen 1 t/m 11 per proef aangegeven of de stof is getest (+) of niet (-). Onder het kader wordt van de drie verschillende geteste concentraties aangegeven hoe aantrekkelijk het mengsel was (- = zeer afstotend, - = afstotend, 0 = neutraal, += aantrekkelijk, ++ = zeer aantrekkelijk. Groen = aantrekkelijk en oker = afstotend.

biotoets resultaten overall 2006 (n=8)

Stoffen	Proefnummer							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	+	-	+	-	+	-	+
2	-	-	+	+	-	-	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+	+
4	+	-	-	+	+	-	-	+
5	+	-	-	+	-	+	-	+
6	+	+	-	-	-	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
0.001%	0	0	0	+	+	-	0	0
0.005%	0	--	0	0	-	--	0	0
0.01%	0	-	--	--	--	-	-	--

Er bleek een invloed te zijn van het keverstadium op de resultaten. Over het algemeen reageerden de kevers van mei gevoeliger op de aangeboden geurmengsels. Zelfs de laagste concentratie van het aantrekkelijke totale mengsel weerde de kevers van mei af, terwijl het aantrekkelijk was in april. Verder was er ook een indicatie dat tussen april en mei een verandering optrad in voorkeur voor bepaalde componenten. Omdat drie concentraties werden getoetst van meercomponenten mengsels trad er een effect op waarbij niet alleen het overall effect veranderde maar ook het effect per concentratie. Daardoor zijn concentratie en stoffen effect niet te scheiden van elkaar zonder extra proeven.

De analyse van het factoriële design gaf aan dat stof 1 en stof 3 repellent werkten. Stof 2 en stof 4 zorgden volgens de analyse voor een grote bijdrage aan de aantrekkelijkheid van het mengsel. Stof 2 bleek zeer aantrekkelijk in april en mei en in de overall resultaten en stof 4 was zeer aantrekkelijk in april en de overall resultaten, maar bleek neutraal in mei. Stof 5 was zeer aantrekkelijk in april maar repellent in mei en overall neutraal. Stof 6 liet een variabel effect zien tussen april en mei bij verschillende concentraties en gaf geen overall effect.

3.1.4 Discussie

De analyse van het factoriële design gaf aan dat stof 1 en stof 3 repellent werkten. Hoewel dit gedeeltelijk kan zijn veroorzaakt door het relatief grote aandeel van deze componenten in de mengsels werd er bij verschillende concentraties toch afweer gevonden bij de hoge concentraties en een neutral effect bij lagere concentraties.

3.1.5 Conclusie

PRI heeft de lokkende componenten kunnen onderscheiden van de niet-lokkende componenten in het bio-actieve synthetische mengsel van tien stoffen. Twee stoffen bleken zeer aantrekkelijk, twee stoffen werkten juist afwerend en twee stoffen gaven een variabel resultaat.

3.1.6 Plannen

Hoewel verder testen van het aantrekkelijke mengsel in de toekomst nodig kan blijken om de lokstof te optimaliseren heeft het testen van de meest attractieve componenten in het veld nu prioriteit.

Voor veldtoetsen is een andere formulering nodig dan voor de labproeven gebruikt. Voor proeven die gedurende de nacht in de veldsituatie worden uitgevoerd, zijn slow-release formuleringen nodig die de geurstoffen vrij laten komen in concentraties die hoog genoeg zijn en met weinig variatie in hoeveelheid en samenstelling van de componenten gedurende de testperiode.

In een eerder stadium van dit project is in het projectteam een discussie geweest of het niet beter is om eerst slow-release korrels te ontwikkelen met de te testen geurstoffen en deze dan pas in een buitensituatie te testen. De fabrikanten wilden dat toch niet. Zij wilden eerst aangetoond zien dat de geurstof/het geurstofmengsel onder buitenomstandigheden een lokkende werking had, alvorens hierin te investeren. Daarom is er toen toch voor gekozen om een proefmethode te ontwikkelen voor het toetsen van simpele geurstof(mengsels) onder buitenomstandigheden.

Op basis van bovenstaande resultaten en overwegingen heeft PRI vier mengsels van aantrekkelijke geurstoffen in een simpele formulering gemaakt, die in het veld konden worden getest.

3.2 Biotoetsen buiten

3.2.1 Doel:

Het testen van vier geurstofmengsels op hun lokkende werking voor volwassen taxuskevers in buitenomstandigheden.

3.2.2 Materiaal en methode

De kevers voor deze biotoetsen kwamen vanuit een kweek.

In het projectvoorstel stond dat de geurmengsels getest zouden worden in kooiproeven, waarvan de methode al bekend was uit eerdere projecten. Bij nader inzien is deze methode niet geschikt omdat in de klimaatkamers een ophoping van geuren op kan treden. Het is beter om proeven buiten te doen, waarbij er natuurlijk licht is, een luchtstroming en geen ophoping van geuren. Bovendien leken de gebruikte vallen in de kooiproeven niet het meest geschikt. Het was beter om een zogenaamde 'pitfall trap' te gebruiken, vergelijkbaar met de val voor pine weevils (*Hylobius abietis*) van Björklund et al. (2005). Dit kon eind 2005 niet meer worden uitgevoerd en is verschoven naar zomer 2006.

In 2006 is door PPO gewerkt aan een methode met een pitfall trap om buiten biotoetsen uit te voeren op aantrekkelijkheid van de mengsels. Er waren problemen om de kevers binnen de testopstelling te houden. Als barrière was een goot met water aangelegd rondom de arena. Het bleek dat de kevers gewoon over het water konden drijven en aan de andere kant weer uit de goot konden klimmen. Daarom is het in 2006 niet gelukt om de biotoetsen uit te voeren en is dit deel van het werk uitgesteld naar 2007.

In de winter van 2006-2007 is in het lab gezocht naar een oplossing om de kevers binnen de arena te kunnen houden. Dit is gelukt met een rand van stucloper, met daarop een laagje fluon. Stucloper (0,3 mm dikte) is een karton dat aan beide kanten is voorzien van een PE coating. Dit is veelal productieafval (misdrukken) van frisdrankpakken en het wordt in de bouw gebruikt voor het afdekken van vloeren etc. ter bescherming. Het is dus sterk, soepel en waterbestendig materiaal. Het is verkregen in een doe-het-zelf winkel. Het is bekend de vloeistof fluon ervoor zorgt dat taxuskevers geen grip meer hebben op de ondergrond en dat ze niet over de fluon weg kunnen lopen.

De vier te testen geurmengsels, waren opgelost in Uvasol paraffine-olie en staan onder code weergegeven in tabel 3.4.

Tabel 3.4 Te testen stoffen in buitenopstelling, onder code

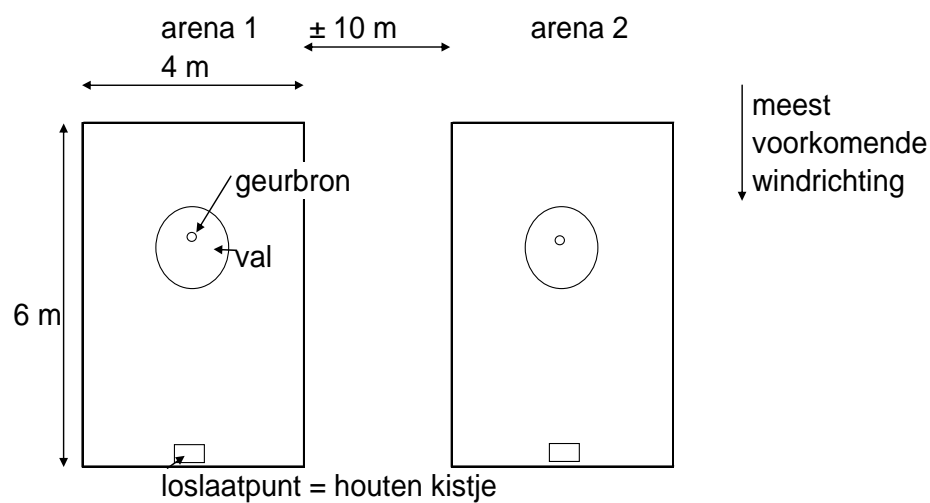
lokstof formulering	hoeveelheid in mg					
	Stof 2	Stof 5	Stof 8	Stof 9	Stof 10	Stof 11
Taxus 01	40	340	110	40	260	80
Taxus 04	40	340	0	0	0	0
Taxus 13	400	3400	1100	400	2600	800
Taxus 14	400	3400	0	0	0	0

In eerste instantie werd Taxus 13 getest. Hierin zitten alle zes de stoffen in de hoogste concentratie, dus hier verwachtten we het meeste van. Afhankelijk van de resultaten hiervan werd gekozen welke lokstof vervolgens getest zou worden.

De tests werden uitgevoerd buiten in een arena, in de periode van 17 juli tot en met 30 augustus. Er waren twee arena's, die ongeveer 10 m uit elkaar lagen (figuur 3.2 en 3.3). Een arena besloeg een oppervlak van 6 x 4 m. Rondom was een 35 cm brede strook stucloper zodanig ingegraven dat een 20 cm hoge keerwand ontstond. Binnen deze afzetting is een kunststof kuip met een diameter van 108 cm en een diepte van 40 cm ingegraven met de bovenrand gelijk aan het maaiveld. In de bodem van de kuip zijn gaten geboord om een goede afwatering mogelijk te maken. Hierdoor was het maken van een afdakje niet nodig. Op de bodem van de kuip is wat zand aangebracht met daarop een laagje zilverzand. Hierdoor zijn de kevers beter zichtbaar. In de kuip is een uit plaatmateriaal gezaagde boom geplaatst die het silhouet van een echte boom moet nabootsen.

Over het vak is een net gespannen om vogels te weren. De staanders van de constructie zijn buiten het vak geplaatst om ontsnapping via die weg te voorkomen.

Om de kevers overdag schuilmogelijkheden te bieden zijn zowel in als buiten de kuip plankjes en latten neergelegd.



Figuur 3.2. Schema proefopstelling



Figuur 3.3. Links: overzicht proefopstelling, rechts: de val. De geurbron werd bevestigd aan het houten silhouet van een boompje

Voor elke toets werd er flon gesmeerd op de rand van stucloper om de arena, zodat de kevers niet uit de arena konden ontsnappen. Ook de rand van de val werd met flon ingesmeerd, zodat kevers die daar eenmaal in gevallen zijn er niet weer uit konden klimmen. Voor elke toets werden weer nieuwe kevers gebruikt. De kevers hadden dus nog geen ervaring in deze proefopstelling. Omdat taxuskevers 's nachts actief zijn, werden de toetsen ook 's nachts uitgevoerd. Aan het eind van de middag werden de kevers uitgezet onder een houten kistje, met spleten erin, via welke ze de arena in konden lopen zodra het donker genoeg was. De geurbronnen werden aangebracht in houdertjes aan de zijkant van de boomsilhouetten, 5 cm hoger dan de rand van de kuip. Het net werd goed dichtgemaakt. Windrichting en weersomstandigheden werden genoteerd.

De volgende ochtend werden de kevers in de arena en in de val geteld. De gevonden kevers werden verwijderd. Windrichting en weersomstandigheden werden weer genoteerd.

Voordat aan een proef in herhalingen begonnen kon worden is eerst gewerkt aan het verder ontwikkelen van de methode. Hiervoor werden tests uitgevoerd met de volgende variaties:

1. Geurbron
2. Aantal losgelaten kevers
3. Hongeren van de kevers
4. Het moment van tellen

Ad 1. Geurbron

Er is *Euonymus* met gekneusd blad getest. Er werden dan drie planten in één van beide vallen gezet en geen geurbron in de andere val. Drie van de geurmengsels zijn getest: Taxus 13, Taxus 14 en Taxus 01. Eerst werd Taxus 13 getest, omdat daarvan het meeste werd verwacht. In dat mengsel waren namelijk alle zes de geurcomponenten aanwezig in de hoogste concentratie. Taxus 14 en taxus 01 zijn elk slechts één maal getest. Taxus 13 is vijf maal getest. De geurmengsels werden getest tegen het oplosmiddel. Eerst werd 1 ml in een epje getest, later 3 ml in een dopje met een doorsnede van 2 cm en later 7 ml in een petrischaal. Er werd hierbij van uitgegaan dat met een grotere hoeveelheid in een bakje met een grotere oppervlakte meer geurstof zou verdampen en dus eventueel de taxuskevers beter zou kunnen lokken. Verder is er nog gevarieerd met de hoogte waarop het geurmengsel werd opgehangen in de val. Eerst werd de geurbron aan het houten silhouet opgehangen, hoger dan het grondoppervlak. Later werd de geurbron in de val gezet. Mogelijk kunnen de kevers op de laatste manier de geurbron beter localiseren.

Ad 2. Aantal losgelaten kevers

In eerste instantie werden 25 kevers per arena losgelaten. Later werden dit er veertig. Dit was omdat de kevers in de eerste tests moeilijk terug te vinden waren. Met meer kevers was de kans groter dat er toch verschillen gevonden zouden worden tussen de behandelingen. Bij de latere tests lukte het wel om de kevers (bijna) allemaal terug te vinden.

Ad 3. Hongeren van de kevers

In een aantal tests werden de kevers direct vanuit de keverkweek gebruikt voor de proeven. In een aantal andere tests werden ze eerst één of enkele nachten weggezet in een emmer zonder voer. In deze emmer waren wel schuilplaatsen (stukken karton) aanwezig en een prop vochtig filtreerpapier, zodat ze niet uitdroogden. Het idee was dat ze in de arena actiever zouden zoeken naar voedsel en dus alerter zouden reageren op de geurbron (die naar voedsel ruikt).

Ad 4. Het moment van tellen

De kevers werden 's ochtends geteld. Ze zitten overdag verscholen, bijvoorbeeld onder de planken. Door onder de planken te kijken konden de kevers in principe eenvoudig worden geteld. Het bleek dat de kevers moeilijk terug te vinden waren, daarom werd er naar meerdere dagen nogmaals geteld.

3.2.3 Resultaten

Tijdens de optimalisatie van de methode is in geen enkele test een lokking van taxuskevers aangetoond. Het is niet gelukt om een goede proefmethode te ontwikkelen.

Het lukte wel om alle kevers binnen de arena te houden. Wanneer na meerdere dagen nogmaals werd geteld, werden ze (bijna) allemaal teruggevonden.

3.2.4 Discussie

Er is geen lokking aangetoond van Taxus 13, Taxus 14 en Taxus 01. Toch kan niet geconcludeerd worden dat deze mengsels niet aantrekkelijk zijn van taxuskevers. Het is namelijk niet gelukt om een goede proefmethode te ontwikkelen, omdat ook *Euonymus* met gekneusd blad in deze opstelling ook geen kevers lokte.

De windrichting was over het algemeen vanuit de richting van de geurbron, dus dit was geen probleem in de proeven. De tests zijn op dagen uitgevoerd dat de weersomstandigheden goed genoeg waren. De weersomstandigheden vormen dus geen verklaring voor de gevonden resultaten.

3.2.5 Conclusie

Er kunnen geen conclusies getrokken worden over de werking van de geurmengsels in buitenomstandigheden. Deze biotoets bleek niet geschikt om de werking van de geurmengsels te testen.

3.2.6 Plannen

In een overleg op 9 oktober 2007 met PPO, PRI, Denka en BASF is vastgesteld dat een succesvolle afronding van fase 1B (dus het beschikbaar hebben van een lokstof, die onder buitenomstandigheden werkt) niet is gehaald. Ondanks een extra eigen investering van PPO heeft het project dus onvoldoende perspectief opgeleverd om fase 2 in te gaan. Daarom is besloten tot beëindiging van dit project.

4 Referenties

Björklund, N., Nordlander, G., & Bylund, H. (2005) Olfactory and visual stimuli used in orientation to conifer seedlings by the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Physiological Entomology* 30: 225-231

Tol, van R. (2002) *Fatal attraction. Novel strategies for vine weevil control*. Amsterdam, Nederland